

P22042.P04

J1017 U.S. PTO
10/086738
03/04/02

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant :A. MIYAWAKI et al.

Serial No. :Not Yet Assigned

Filed :Concurrently Herewith

For :A FLUORESCENT PROTEIN

CLAIM OF PRIORITY

Commissioner of Patents and Trademarks
Washington, D.C. 20231

Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 based upon Japanese Application No. 2001-059892, filed March 5, 2001. As required by 37 C.F.R. 1.55, a certified copy of the Japanese application is being submitted herewith.

Respectfully submitted,
A. MIYAWAKI et al.

Bruce H. Bernstein
Reg. No. 29,027

March 4, 2002
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.
1941 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191
(703) 716-1191

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

J1017 U.S. PTO
10/086738
03/04/02

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日
Date of Application: 2001年 3月 5日

出願番号
Application Number: 特願2001-059892

[ST.10/C]: [JP2001-059892]

出願人
Applicant(s): 理化学研究所

2002年 2月 15日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造

出証番号 出証特2002-3008180

【書類名】 特許願

【整理番号】 A11060MA

【提出日】 平成13年 3月 5日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内

【氏名】 宮脇 敦史

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内

【氏名】 永井 健治

【特許出願人】

【識別番号】 000006792

【氏名又は名称】 理化学研究所

【代理人】

【識別番号】 100092635

【弁理士】

【氏名又は名称】 塩澤 寿夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100096219

【弁理士】

【氏名又は名称】 今村 正純

【選任した代理人】

【識別番号】 100095843

【弁理士】

【氏名又は名称】 釜田 淳爾

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 007663

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 9607613
【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 蛍光タンパク質

【特許請求の範囲】

【請求項1】 N末端からC末端方向に以下のアミノ酸配列(1)～(3)を順番に有する蛍光タンパク質において、当該蛍光タンパク質にカルシウム結合タンパク質とその標的ペプチドとを融合して得られる融合蛍光タンパク質がCa²⁺イオンの量に依存した蛍光を発することができることを特徴とする、蛍光タンパク質。

(1) 緑色蛍光タンパク質又はその変異体、黄色蛍光タンパク質またはその変異体、シアン蛍光タンパク質またはその変異体、赤色蛍光タンパク質またはその変異体、及び青色蛍光タンパク質またはその変異体から成る群から選択される蛍光タンパク質のN末端からn番目のアミノ酸からC末端までのアミノ酸配列(ただし、nは140から150までの整数を示す)；

(2) 2～20個のアミノ酸配列から成るリンカー配列；及び

(3) 上記(1)に記載した蛍光タンパク質のN末端の1番目からn-1番目のアミノ酸配列：

【請求項2】 融合蛍光タンパク質がCa²⁺イオンの存在下においてその量に依存して異なる強度の蛍光を発することができる、請求項1に記載の蛍光タンパク質。

【請求項3】 融合蛍光タンパク質がCa²⁺イオンの存在下においてその量に依存して異なる波長の励起を示す、請求項1に記載の蛍光タンパク質。

【請求項4】 リンカー配列のアミノ酸配列がGly-Gly-Ser-Gly-Gly又はVal-Asp-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Thr-Glyである、請求項1から3の何れか1項に記載の蛍光タンパク質。

【請求項5】 以下の何れかの蛍光タンパク質。

(A) 配列番号1に記載のアミノ酸配列のうち32番目から275番目までのアミノ酸を有するタンパク質、又は配列番号1に記載のアミノ酸配列のうち32番目から275番目までのアミノ酸において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び/又は付加を有するアミノ酸配列を有し、配列番号1に記載のアミノ酸配列の

うち32番目から275番目までのアミノ酸を有するタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質：

(B) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち32番目から278番目までのアミノ酸を有するタンパク質、又は配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち32番目から278番目までのアミノ酸において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち32番目から278番目までのアミノ酸を有するタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質：又は

(C) 配列番号3に記載のアミノ酸配列のうち32番目から278番目までのアミノ酸を有するタンパク質、又は配列番号3に記載のアミノ酸配列のうち32番目から278番目までのアミノ酸において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、配列番号3に記載のアミノ酸配列のうち32番目から278番目までのアミノ酸を有するタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質：

【請求項6】 N末端からC末端方向に以下のアミノ酸配列(1)～(5)を順番に有する融合蛍光タンパク質において、Ca²⁺イオンの量に依存した蛍光を発することができることを特徴とする、融合蛍光タンパク質。

- (1) カルシウム結合タンパク質の標的ペプチドのアミノ酸配列；
- (2) 緑色蛍光タンパク質又はその変異体、黄色蛍光タンパク質またはその変異体、シアン蛍光タンパク質またはその変異体、赤色蛍光タンパク質またはその変異体、及び青色蛍光タンパク質またはその変異体から成る群から選択される蛍光タンパク質のN末端からn番目のアミノ酸からC末端までのアミノ酸配列（ただし、nは140から150までの整数を示す）；
- (3) 2～20個のアミノ酸配列から成るリンカー配列；及び
- (4) 上記(2)に記載した蛍光タンパク質のN末端の1番目からn-1番目のアミノ酸配列；
- (5) カルシウム結合タンパク質のアミノ酸配列；

【請求項7】 Ca²⁺イオンの存在下においてその量に依存して異なる強度の蛍光を発することができる、請求項6に記載の融合蛍光タンパク質。

【請求項8】 Ca^{2+} イオンの存在下においてその量に依存して異なる波長の励起を示す、請求項6に記載の融合蛍光タンパク質。

【請求項9】 リンカー配列のアミノ酸配列がGly-Gly-Ser-Gly-Gly又はVal-Asp-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Thr-Glyである、請求項6から8の何れか1項に記載の融合蛍光タンパク質。

【請求項10】 カルシウム結合タンパク質が、カルモジュリン、トロポニンC、カルシニューリンB、ミオシン軽鎖、レコベリン、S-モジュリン、ビシン、VILIP、ニューロカルシン、ヒポカルシン、フレクエニン、カルトラクチン、カルパイン・ラージ・サブユニット、S100プロテイン、パルバルブミン、カルビンジンD_{9K}、カルビンジンD_{28K}及びカルレチニンから成る群から選ばれるタンパク質である、請求項6から9の何れか1項に記載の融合蛍光タンパク質。

【請求項11】 以下の何れかの融合蛍光タンパク質。

(A) 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質、又は配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質：

(B) 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質、又は配列番号2に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質：又は

(C) 配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質、又は配列番号3に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質：

【請求項12】 請求項6から11の何れかに記載の融合蛍光タンパク質から成るカルシウムイオン指示薬。

【請求項13】 請求項6から11の何れかに記載の融合蛍光タンパク質を用いて細胞内のカルシウムイオンの濃度又は分布を測定する方法。

【請求項14】 請求項1から5の何れかに記載の蛍光タンパク質をコードするDNA。

【請求項15】 以下の何れかのDNA。

(A) 配列番号1に記載の塩基配列のうち94番目から825番目までの塩基配列を有するDNA、又は配列番号1に記載のアミノ酸配列のうち94番目から825番目までの塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、配列番号1に記載の塩基配列のうち94番目から825番目までの塩基配列を有するDNAがコードするタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質をコードするDNA；

(B) 配列番号2に記載の塩基配列のうち94番目から834番目までの塩基配列を有するDNA、又は配列番号2に記載の塩基配列のうち94番目から834番目までの塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、配列番号2に記載の塩基配列のうち94番目から834番目までの塩基配列を有するDNAがコードするタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質をコードするDNA；又は

(C) 配列番号3に記載の塩基配列のうち94番目から834番目までの塩基配列を有するDNA、又は配列番号3に記載の塩基配列のうち94番目から834番目までの塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、配列番号2に記載の塩基配列のうち94番目から834番目までの塩基配列を有するDNAがコードするタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質をコードするDNA；

【請求項16】 請求項6から11の何れかに記載の融合蛍光タンパク質をコードするDNA。

【請求項17】 以下の何れかのDNA。

(A) 配列番号1に記載の塩基配列を有するDNA、又は配列番号1に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、配列番号1に記載の塩基配列がコードするタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質をコードするDNA；

(B) 配列番号2に記載の塩基配列を有するDNA、又は配列番号2に記載の塩

基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、配列番号2に記載の塩基配列がコードするタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質をコードするDNA；又は

(C) 配列番号3に記載の塩基配列を有するDNA、又は配列番号3に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、配列番号3に記載の塩基配列がコードするタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質をコードするDNA；

【請求項18】 請求項14から17の何れかに記載のDNAを有する組み換えベクター。

【請求項19】 請求項14から17の何れかに記載のDNA又は請求項18に記載の組み換えベクターを有する形質転換体。

【請求項20】 請求項19に記載の形質転換体を用いて、該形質転換体中のカルシウムイオン濃度又は分布を当該形質転換体が発する蛍光を指標にして測定する方法。

【請求項21】 請求項1から5の何れかに記載の蛍光タンパク質、請求項6から11の何れかに記載の融合蛍光タンパク質、請求項12に記載のカルシウムイオン指示薬、請求項14から17の何れかに記載のDNA、請求項18に記載の組み換えベクター、請求項19に記載の形質転換体から選択される少なくとも1種以上を含むことを特徴とする、カルシウムイオンを測定するためのキット

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、Ca²⁺イオン指示薬として有用な蛍光タンパク質に関する。より詳細には、本発明は、緑色蛍光タンパク質や黄色蛍光タンパク質などの蛍光タンパク質にサーチュラーパーミュテーションを施すことによって調製される、Ca²⁺イオンの量に依存した蛍光を発することができる蛍光タンパク質に関する。

【0002】

【従来の技術】

緑色蛍光タンパク質 (GFP) の蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) の利用により、単一の生細胞におけるタンパク質のヘテロマー化および立体構造変化を視覚化することができる (Tsien, R. Y. & Miyawaki, A. (1998) *Science* 280, 1954-1955)。FRETは色が異なる2種のGFPを使用するものである。

【0003】

野生型GFP (WT-GFP) は、発色団のプロトン化状態および脱プロトン化状態に各々対応する、2つの最大ピーク395nmおよび475nmを伴なう二峰性吸収スペクトルを有する (Tsien, R. Y. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* 67, 509-44)。イオン化状態は、発色団とそれを取り囲む複数のアミノ酸との間の極性相互作用の複雑なネットワークを含むプロトンネットワークにより調節される。WT-GFPとは対照的に、ほとんどのGFP変異体の発色団は单一のpKa値で滴定される。これは、外部操作の結果、内部のプロトン平衡が破壊されたことを示す (Llopis, J., McCaffery, J. M., Miyawaki, A., Farquhar, M. G. & Tsien, R. Y. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6803-6808)。GFP変異体の1つとして黄色蛍光タンパク質 (YFP) がある。YFPは、528nmでのレッドシフト発光をもたらすT203Y置換を有する。203番目のアミノ酸位置に導入されたチロシンは発色団とのπスタッキング相互作用に関与することが予測されたが (Ormo, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y. & Remington, S. J. (1996) *Science* 273, 1392-1395)、これはX線結晶測定により証明された (Wachter, R. M., Elsliger, M. A., Kallio, K., Hanson, G. T. & Remington S. J. (1998) *Structure* 6, 1267-1277)。

【0004】

GFP変異体の緻密な「 β -can」構造 (Yang, F., Moss, L. G. & Phillips, G. N., Jr. (1996) *Nat. Biotech.* 14, 1246-1251) 内に、Bairdらは、ポリペプチドの2つの部分が中央部位の周りにフリップするサーキュラーパーミュテーション (circular permutations) を許容する可能性がある部位を見出した (Baird, G. S., Zacharias, D.A. & Tsien, R. Y. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11241-11246)。 β -canの開裂のため、サーキュラーパーミュテーションを行ったGFP (cpGFP) の発色団はタンパク質の外側のプロトンにはこれ以上接近できな

いと思われた。cpGFPの使用は、2つのタンパク質ドメイン間の相互作用シグナルを発色団の静電気的変化に変換する上で、即ち、相互作用の情報を蛍光シグナルに変換する上で興味深い。

【0005】

しかしながら、カルシウムイオンに感受性のあるcpGFP、特に37℃においてカルシウムイオン濃度を定量化するための指示薬として使用できるcpGFPについては未だ報告されていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、カルシウムイオンに感受性のある新規な蛍光タンパク質、特に37℃においてカルシウムイオン濃度を定量化するための指示薬として使用できる蛍光タンパク質を提供することを解決すべき課題とした。

【0007】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために本発明者らは銳意検討を重ね、カルモジュリン(CaM)およびM13(骨格筋ミオシン軽鎖キナーゼのCaM結合領域に由来する26残基ペプチド)(Blumenthal, D. K., & Krebs, E. G. (1987) *Methods Enzymol.* 139, 115-126)を融合したcpYFPを構築した。なお、 Ca^{2+} が結合したCaM(Ca^{2+} -CaM)およびM13ペプチドは安定かつ緻密な複合体を形成し、この複合体の溶液構造は多次元NMRにより測定されている(Ikura, M., Clore, G. M., Gronenborn A. M., Zhu, G., Klee, C. B. & Bax, A. (1992) *Science* 256, 632-638)。

【0008】

さらに本発明者らは、M13、cpYFPおよびCaMから構成されるキメラ融合タンパク質の蛍光特性を調べた結果、この蛍光特性は、CaMとM13との間の Ca^{2+} 依存性相互作用に応じて変化することが判明した。さらに、スペクトル変化の挙動は、cpYFPのプロトンネットワークに影響し得る変異により変動することも判明した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

【0009】

即ち、本発明によれば、N末端からC末端方向に以下のアミノ酸配列(1)～

(3) を順番に有する蛍光タンパク質において、当該蛍光タンパク質にカルシウム結合タンパク質とその標的ペプチドとを融合して得られる融合蛍光タンパク質がCa²⁺イオンの量に依存した蛍光を発することができることを特徴とする、蛍光タンパク質が提供される。

(1) 緑色蛍光タンパク質又はその変異体、黄色蛍光タンパク質またはその変異体、シアン蛍光タンパク質またはその変異体、赤色蛍光タンパク質またはその変異体、及び青色蛍光タンパク質またはその変異体から成る群から選択される蛍光タンパク質のN末端からn番目のアミノ酸からC末端までのアミノ酸配列（ただし、nは140から150までの整数を示す）；

(2) 2～20個のアミノ酸配列から成るリンカー配列；及び

(3) 上記(1)に記載した蛍光タンパク質のN末端の1番目からn-1番目のアミノ酸配列：

【0010】

本発明において好ましくは、融合蛍光タンパク質はCa²⁺イオンの存在下においてその量に依存して異なる強度の蛍光を発することができるか、又は融合蛍光タンパク質はCa²⁺イオンの存在下においてその量に依存して異なる波長の励起を示すことができる。

好ましくは、リンカー配列のアミノ酸配列がGly-Gly-Ser-Gly-Gly又はVal-Asp-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Thr-Glyである。

【0011】

本発明の蛍光タンパク質の具体例としては、以下の何れかの蛍光タンパク質が挙げられる。

(A) 配列番号1に記載のアミノ酸配列のうち32番目から275番目までのアミノ酸を有するタンパク質、又は配列番号1に記載のアミノ酸配列のうち32番目から275番目までのアミノ酸において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び/又は付加を有するアミノ酸配列を有し、配列番号1に記載のアミノ酸配列のうち32番目から275番目までのアミノ酸を有するタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質；

(B) 配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち32番目から278番目までのア

ミノ酸を有するタンパク質、又は配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち32番目から278番目までのアミノ酸において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち32番目から278番目までのアミノ酸を有するタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質：又は

(C) 配列番号3に記載のアミノ酸配列のうち32番目から278番目までのアミノ酸を有するタンパク質、又は配列番号3に記載のアミノ酸配列のうち32番目から278番目までのアミノ酸において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、配列番号3に記載のアミノ酸配列のうち32番目から278番目までのアミノ酸を有するタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質：

【0012】

本発明の別の側面によれば、N末端からC末端方向に以下のアミノ酸配列(1)～(5)を順番に有する融合蛍光タンパク質において、Ca²⁺イオンの量に依存した蛍光を発することができることを特徴とする、融合蛍光タンパク質が提供される。

- (1) カルシウム結合タンパク質の標的ペプチドのアミノ酸配列；
- (2) 緑色蛍光タンパク質又はその変異体、黄色蛍光タンパク質またはその変異体、シアン蛍光タンパク質またはその変異体、赤色蛍光タンパク質またはその変異体、及び青色蛍光タンパク質またはその変異体から成る群から選択される蛍光タンパク質のN末端からn番目のアミノ酸からC末端までのアミノ酸配列(ただし、nは140から150までの整数を示す)；
- (3) 2～20個のアミノ酸配列から成るリンカー配列；及び
- (4) 上記(2)に記載した蛍光タンパク質のN末端の1番目からn-1番目のアミノ酸配列；
- (5) カルシウム結合タンパク質のアミノ酸配列；

【0013】

本発明の融合蛍光タンパク質は好ましくは、Ca²⁺イオンの存在下においてその量に依存して異なる強度の蛍光を発することができるか、又はCa²⁺イオンの

存在下においてその量に依存して異なる波長の励起を示すことができる。

好ましくは、リンカー配列のアミノ酸配列はGly-Gly-Ser-Gly-Gly又はVal-Asp-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Thr-Glyである。

カルシウム結合タンパク質は好ましくは、カルモジュリン、トロポニンC、カルシニューリンB、ミオシン軽鎖、レコベリン、S-モジュリン、ビシニン、VILIP、ニューロカルシン、ヒポカルシン、フレクエニン、カルトラクチン、カルパイン・ラージ・サブユニット、S100プロテイン、パルバルブミン、カルビンジンD_{9K}、カルビンジンD_{28K}及びカルレチニンから成る群から選ばれるタンパク質である。

【0014】

本発明の融合蛍光タンパク質の具体例としては、以下の何れかの融合蛍光タンパク質が挙げられる。

(A) 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質、又は配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び/又は付加を有するアミノ酸配列を有し、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質：

(B) 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質、又は配列番号2に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び/又は付加を有するアミノ酸配列を有し、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質：又は

(C) 配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質、又は配列番号3に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び/又は付加を有するアミノ酸配列を有し、配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質：

【0015】

本発明のさらに別の側面によれば、上記融合蛍光タンパク質から成るカルシウムイオン指示薬、並びに上記融合蛍光タンパク質を用いて細胞内のカルシウムイオンの濃度又は分布を測定する方法が提供される。

【0016】

本発明のさらに別の側面によれば、上記蛍光タンパク質をコードするDNAが提供され、その具体例としては、以下の何れかのDNAが提供される。

(A) 配列番号1に記載の塩基配列のうち94番目から825番目までの塩基配列を有するDNA、又は配列番号1に記載のアミノ酸配列のうち94番目から825番目までの塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、配列番号1に記載の塩基配列のうち94番目から825番目までの塩基配列を有するDNAがコードするタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質をコードするDNA；

(B) 配列番号2に記載の塩基配列のうち94番目から834番目までの塩基配列を有するDNA、又は配列番号2に記載の塩基配列のうち94番目から834番目までの塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、配列番号2に記載の塩基配列のうち94番目から834番目までの塩基配列を有するDNAがコードするタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質をコードするDNA；又は

(C) 配列番号3に記載の塩基配列のうち94番目から834番目までの塩基配列を有するDNA、又は配列番号3に記載の塩基配列のうち94番目から834番目までの塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、配列番号2に記載の塩基配列のうち94番目から834番目までの塩基配列を有するDNAがコードするタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質をコードするDNA；

【0017】

本発明のさらに別の側面によれば、上記融合蛍光タンパク質をコードするDNAが提供され、その具体例としては、以下の何れかのDNAが提供される。

(A) 配列番号1に記載の塩基配列を有するDNA、又は配列番号1に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、配列番号1に記載の塩基配列がコードするタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質をコードするDNA；

(B) 配列番号2に記載の塩基配列を有するDNA、又は配列番号2に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列

を有し、配列番号2に記載の塩基配列がコードするタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質をコードするDNA；又は

(C) 配列番号3に記載の塩基配列を有するDNA、又は配列番号3に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、配列番号3に記載の塩基配列がコードするタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質をコードするDNA；

【0018】

本発明のさらに別の側面によれば、上記DNAを有する組み換えベクターが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記DNA又は上記組み換えベクターを有する形質転換体が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記形質転換体を用いて、該形質転換体中のカルシウムイオン濃度又は分布を当該形質転換体が発する蛍光を指標にして測定する方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記蛍光タンパク質、上記融合蛍光タンパク質、上記カルシウムイオン指示薬、上記DNA、上記組み換えベクター、上記形質転換体から選択される少なくとも1種以上を含むことを特徴とする、カルシウムイオンを測定するためのキットが提供される。

【0019】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施方法および実施態様について詳細に説明する。

(1) 本発明の蛍光タンパク質

本発明は、N末端からC末端方向に以下のアミノ酸配列(1)～(3)を順番に有する蛍光タンパク質において、当該蛍光タンパク質にカルシウム結合タンパク質とその標的ペプチドとを融合して得られる融合蛍光タンパク質がCa²⁺イオンの量に依存した蛍光を発することができることを特徴とする、蛍光タンパク質に関する。

(1) 緑色蛍光タンパク質又はその変異体、黄色蛍光タンパク質またはその変異体、シアン蛍光タンパク質またはその変異体、赤色蛍光タンパク質またはその変

異体、及び青色蛍光タンパク質またはその変異体から成る群から選択される蛍光タンパク質のN末端からn番目のアミノ酸からC末端までのアミノ酸配列（ただし、nは140から150までの整数を示す）；

（2）2～20個のアミノ酸配列から成るリンカー配列；及び

（3）上記（1）に記載した蛍光タンパク質のN末端の1番目からn-1番目のアミノ酸配列：

【0020】

本明細書で言う、緑色蛍光タンパク質又はその変異体、黄色蛍光タンパク質またはその変異体、シアン蛍光タンパク質またはその変異体、赤色蛍光タンパク質またはその変異体、及び青色蛍光タンパク質またはその変異体とは、各々公知の蛍光タンパク質またはその変異体の全てを包含する意味である。例えば、また、GFP遺伝子は単離され配列も決定されている(Prasher, D.C. ら(1992), "Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein", Gene 111: 229-233)。その他の蛍光タンパク質又はその変異体のアミノ酸配列も多数報告されており、例えば、Roger Y.Tsin, Annu.Rev.Biochem.1998. 67:509-44、並びにその引用文献に記載されている。Delagrange, S. 他 (1995) , Red-shifted excitation mutants of the green fluorescent protein, Bio/Technology 13 : 151-154は、赤にシフトした励起スペクトルを有するクローニングされたアエクオレア・ビクトリアGFPの変異体を単離している。Heim, R. ら (1994) , Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 : 12501-12504は、そこでBFP(Tyr₆₆→His)で示される青色蛍光を有する変異体(Tyr₆₆からHis)を報告している。

【0021】

本発明の蛍光タンパク質では、上記した蛍光タンパク質のN末端からn番目のアミノ酸からC末端までのアミノ酸配列（ただし、nは140から150までの整数を示す）をN末端側に有し、リンカー配列を挟んで、上記した蛍光タンパク質のN末端の1番目からn-1番目のアミノ酸配列をC末端側に有する構造をとっている。このようにタンパク質の構造を変化させることをサーキュラーパーミュテーションとも称する。本発明では、上記したような公知の蛍光タンパク質に

サーチュラーパーミュテーションを施すことによって、カルシウムイオン指示薬として有用な新規な蛍光タンパク質を作製することに初めて成功した。

【0022】

リンカー配列のアミノ酸配列は、作製される融合蛍光タンパク質がカルシウムイオン指示薬として所望の効果を発揮する限り、特に限定されないが、側鎖が比較的小さいアミノ酸配列を主として含むことが好ましく、また親水性の側鎖を有するアミノ酸が好ましい。アミノ酸の個数は通常2～20個程度であり、好ましくは3～10個程度であり、特に好ましくは5～10個程度である。リンカー配列の具体例としては、Gly-Gly-Ser-Gly-Gly（配列番号4）又はVal-Asp-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Thr-Gly（配列番号5）等が挙げられるが、これらに限定されるものでもない。

【0023】

本発明の蛍光タンパク質の具体例としては、以下の何れかの蛍光タンパク質が挙げられる。

（A）配列番号1に記載のアミノ酸配列のうち32番目から275番目までのアミノ酸を有するタンパク質、又は配列番号1に記載のアミノ酸配列のうち32番目から275番目までのアミノ酸において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、配列番号1に記載のアミノ酸配列のうち32番目から275番目までのアミノ酸を有するタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質；

（B）配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち32番目から278番目までのアミノ酸を有するタンパク質、又は配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち32番目から278番目までのアミノ酸において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち32番目から278番目までのアミノ酸を有するタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質；又は

（C）配列番号3に記載のアミノ酸配列のうち32番目から278番目までのアミノ酸を有するタンパク質、又は配列番号3に記載のアミノ酸配列のうち32番目から278番目までのアミノ酸において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及

び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、配列番号3に記載のアミノ酸配列のうち32番目から278番目までのアミノ酸を有するタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質：

【0024】

本明細書で言う「1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列」における「1から数個」の範囲は特に限定されないが、例えば、1から20個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から7個、さらに好ましくは1から5個、特に好ましくは1から3個程度を意味する。

本明細書で言う「同等以上の蛍光特性を有する」とは、当該蛍光タンパク質にカルシウム結合タンパク質とその標的ペプチドとを融合して得られる融合蛍光タンパク質がCa²⁺イオンの量に依存して発する蛍光の特性が同等以上であることを意味する。

【0025】

本発明の蛍光タンパク質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成したタンパク質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換えタンパク質でもよい。

組み換えタンパク質を作製する場合には、先ず当該タンパク質をコードするDNAを入手することが必要である。本明細書の配列表の配列番号1～3に記載したアミノ酸配列及び塩基配列の情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、それらを用いて上記したような各種の公知の蛍光タンパク質のcDNAクローンを鑄型にしてPCRを行うことにより、本発明の蛍光タンパク質をコードするDNAを構築するのに必要なDNA断片を作製することができる。次いで、これらのDNA断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の蛍光タンパク質をコードするDNAを得ることができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の蛍光タンパク質を産生することができる。発現系での発現については本明細書中後記する。

【0026】

(2) 本発明の融合蛍光タンパク質及びその利用

本発明はさらに、上記の(1)で説明した蛍光タンパク質にN末端にカルシウ

ム結合タンパク質の標的ペプチドのアミノ酸配列を有し、C末端にカルシウム結合タンパク質のアミノ酸配列を有することを特徴とする、融合蛍光タンパク質に関する。

本発明で用いるカルシウム結合タンパク質としては、カルモジュリン、トロポニンC、カルシニューリンB、ミオシン軽鎖、レコベリン、S-モジュリン、ビシニン、VILIP、ニューロカルシン、ヒポカルシン、フレクエニン、カルトラクチン、カルパイン・ラージ・サブユニット、S100プロテイン、パルバルブミン、カルビンジンD_{9K}、カルビンジンD_{28K}及びカルレチニンなどが挙げられ、この中でも特にカルモジュリンを用いることが好ましい。

【0027】

本発明の融合蛍光タンパク質のN末端側に存在するカルシウム結合タンパク質の標的ペプチドのアミノ酸配列は、C末端側に存在するカルシウム結合タンパク質に応じて当業者であれば適宜選択することができる。

例えば、カルシウム結合タンパク質がカルモジュリンの場合には、カルモジュリンの標的物質として知られる各種のタンパク質やペプチド中に存在することが知られているカルモジュリン結合ドメインのアミノ酸配列を、本発明の融合蛍光タンパク質のN末端側に存在させることができる。このようなカルモジュリン結合ドメインのアミノ酸配列は、これまで1200種類以上が知られている。カルモジュリン結合ドメインデータベース(<http://calcium.oci.utoronto.ca/ctdb>)で検索可能である。

【0028】

本発明の融合蛍光タンパク質の具体例としては、以下の何れかの蛍光タンパク質が挙げられる。

(A) 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質、又は配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び/又は付加を有するアミノ酸配列を有し、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質：

(B) 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質、又は配列番号2に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び/又は付加

を有するアミノ酸配列を有し、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質：又は

(C) 配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質、又は配列番号3に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質：

【0029】

本発明の融合蛍光タンパク質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成したタンパク質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換えタンパク質でもよい。

組み換えタンパク質を作製する場合には、先ず当該タンパク質をコードするDNAを入手することが必要である。本明細書の配列表の配列番号1～3に記載したアミノ酸配列及び塩基配列の情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、それらを用いて上記したような各種の公知の蛍光タンパク質のcDNAクローンを鋳型にしてPCRを行うことにより、蛍光タンパク質をコードするDNAを構築するのに必要なDNA断片を作製することができる。また、同様に、適当なプライマーを使用するPCR等の公知の手法により、カルシウム結合タンパク質と当該タンパク質の標的ペプチドをそれぞれコードするDNA断片を作製する。次いで、これらのDNA断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の融合蛍光タンパク質をコードするDNAを得ることができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の融合蛍光タンパク質を産生することができる。発現系での発現については本明細書中後記する。

【0030】

本発明の融合蛍光タンパク質は、細胞内のカルシウムイオン濃度を測定したり、カルシウムイオン分布をモニターするために使用することができ、カルシウムイオン指示薬として有用である。カルシウムイオン濃度およびカルシウムイオン分布は、本発明の融合蛍光タンパク質をコードする遺伝子を細胞内へ導入することによりモニターすることが可能となる。蛍光の測定は公知の方法に準じて行うことができる。

【0031】

(3) 本発明のDNA

さらに、本発明は、本発明の蛍光タンパク質または融合蛍光タンパク質をコードする遺伝子を提供するものである。

本発明の蛍光タンパク質をコードするDNAの具体例としては、以下の何れかのDNAが挙げられる。

(A) 配列番号1に記載の塩基配列のうち94番目から825番目までの塩基配列を有するDNA、又は配列番号1に記載のアミノ酸配列のうち94番目から825番目までの塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、配列番号1に記載の塩基配列のうち94番目から825番目までの塩基配列を有するDNAがコードするタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質をコードするDNA；

(B) 配列番号2に記載の塩基配列のうち94番目から834番目までの塩基配列を有するDNA、又は配列番号2に記載の塩基配列のうち94番目から834番目までの塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、配列番号2に記載の塩基配列のうち94番目から834番目までの塩基配列を有するDNAがコードするタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質をコードするDNA；又は

(C) 配列番号3に記載の塩基配列のうち94番目から834番目までの塩基配列を有するDNA、又は配列番号3に記載の塩基配列のうち94番目から834番目までの塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、配列番号2に記載の塩基配列のうち94番目から834番目までの塩基配列を有するDNAがコードするタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質をコードするDNA；

【0032】

また、本発明の融合蛍光タンパク質をコードするDNAとしては、以下の何れかのDNAが挙げられる。

(A) 配列番号1に記載の塩基配列を有するDNA、又は配列番号1に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列

を有し、配列番号1に記載の塩基配列がコードするタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質をコードするDNA；

(B) 配列番号2に記載の塩基配列を有するDNA、又は配列番号2に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、配列番号2に記載の塩基配列がコードするタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質をコードするDNA；又は

(C) 配列番号3に記載の塩基配列を有するDNA、又は配列番号3に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、配列番号3に記載の塩基配列がコードするタンパク質と同等以上の蛍光特性を有するタンパク質をコードするDNA；

【0033】

本明細書において「1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列」における「1から数個」の範囲は特に限定されないが、例えば、1から60個、好ましくは1から30個、より好ましくは1から20個、さらに好ましくは1から10個、特に好ましくは1から5個程度を意味する。

本発明のDNA又はその断片は、例えばホスホアミダイト法などにより合成することができるし、特異的プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって製造することもできる。本発明のDNA又はその断片の作製方法については、本明細書中の（1）本発明の蛍光タンパク質及び（2）本発明の融合蛍光タンパク質及びその利用、において上述した通りである。

【0034】

また、所定の核酸配列に所望の変異を導入する方法は当業者に公知である。例えば、部位特異的変異誘発法、縮重オリゴヌクレオチドを用いるPCR、核酸を含む細胞の変異誘発剤又は放射線への露出等の公知の技術を適宜使用することによって、変異を有するDNAを構築することができる。このような公知の技術は、例えば、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989、並びにCurrent Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)に記載されている。

【0035】

(4) 本発明の組み換えベクター

本発明のDNAは適当なベクター中に挿入して使用することができる。本発明で用いるベクターの種類は特に限定されず、例えば、自立的に複製するベクター（例えばプラスミド等）でもよいし、あるいは、宿主細胞に導入された際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、組み込まれた染色体と共に複製されるものであってもよい。

好ましくは、本発明で用いるベクターは発現ベクターである。発現ベクターにおいて本発明のDNAは、転写に必要な要素（例えば、プロモーター等）が機能的に連結されている。プロモータは宿主細胞において転写活性を示すDNA配列であり、宿主の種類に応じて適宜することができる。

【0036】

細菌細胞で作動可能なプロモータとしては、バチルス・ステアロテルモフィルス・マルトジエニック・アミラーゼ遺伝子(*Bacillus stearothermophilus maltogenic amylase gene*)、バチルス・リケニホルミス α アミラーゼ遺伝子(*Bacillus licheniformis alpha-amylase gene*)、バチルス・アミロリケファチエンス・BANアミラーゼ遺伝子(*Bacillus amyloliquefaciens BAN amylase gene*)、バチルス・サブチリス・アルカリプロテアーゼ遺伝子(*Bacillus Subtilis alkaline protease gene*)もしくはバチルス・プミルス・キシロシダーゼ遺伝子(*Bacillus pumilus xylosidase gene*)のプロモータ、またはファージ・ラムダのP_R若しくはP_Lプロモータ、大腸菌の lac、trp若しくはtacプロモータなどが挙げられる。

【0037】

哺乳動物細胞で作動可能なプロモータの例としては、SV40プロモータ、MT-1（メタロチオネイン遺伝子）プロモータ、またはアデノウイルス2主後期プロモータなどがある。昆虫細胞で作動可能なプロモータの例としては、ポリヘドリンプロモータ、P10プロモータ、オートグラファ・カリホルニカ・ポリヘドロシス塩基性タンパクプロモータ、バキュウロウイルス即時型初期遺伝子1プロモータ、またはバキュウロウイルス39K遅延型初期遺伝子プロモータ等がある。酵母宿主細胞で作動可能なプロモータの例としては、酵母解糖系遺伝子由来

のプロモータ、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子プロモータ、TPI1プロモータ、ADH2-4cプロモータなどが挙げられる。

糸状菌細胞で作動可能なプロモータの例としては、ADH3プロモータまたはtpiAプロモータなどがある。

【0038】

また、本発明のDNAは必要に応じて、例えばヒト成長ホルモンターミネータまたは真菌宿主についてはTPI1ターミネータ若しくはADH3ターミネータのような適切なターミネータに機能的に結合されてもよい。本発明の組み換えベクターは更に、ポリアデニレーションシグナル(例えばSV40またはアデノウイルス5E1b領域由来のもの)、転写エンハンサ配列(例えばSV40エンハンサ)および翻訳エンハンサ配列(例えばアデノウイルスVA RNAをコードするもの)のような要素を有していてもよい。

本発明の組み換えベクターは更に、該ベクターが宿主細胞内で複製することを可能にするDNA配列を具備してもよく、その一例としてはSV40複製起点(宿主細胞が哺乳類細胞のとき)が挙げられる。

【0039】

本発明の組み換えベクターはさらに選択マーカーを含有してもよい。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)またはシゾサッカロマイセス・ポンベTPI遺伝子等のようなその補体が宿主細胞に欠けている遺伝子、または例えばアンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン若しくはヒグロマイシンのような薬剤耐性遺伝子を挙げることができる。

本発明のDNA、プロモータ、および所望によりターミネータおよび/または分泌シグナル配列をそれぞれ連結し、これらを適切なベクターに挿入する方法は当業者に周知である。

【0040】

(5) 本発明の形質転換体

本発明のDNA又は組み換えベクターを適当な宿主に導入することによって形質転換体を作製することができる。

本発明のDNAまたは組み換えベクターを導入される宿主細胞は、本発明のDNA構築物を発現できれば任意の細胞でよく、細菌、酵母、真菌および高等真核細胞等が挙げられる。

【0041】

細菌細胞の例としては、バチルスまたはストレプトマイセス等のグラム陽性菌又は大腸菌等のグラム陰性菌が挙げられる。これら細菌の形質転換は、プロトプラスト法、または公知の方法でコンピテント細胞を用いることにより行なえばよい。

哺乳類細胞の例としては、HEK293細胞、HeLa細胞、COS細胞、BHK細胞、CHL細胞またはCHO細胞等が挙げられる。哺乳類細胞を形質転換し、該細胞に導入されたDNA配列を発現させる方法も公知であり、例えば、エレクトロポーレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を用いることができる。

【0042】

酵母細胞の例としては、サッカロマイセスまたはシゾサッカロマイセスに属する細胞が挙げられ、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)またはサッカロマイセス・クルイベリ(*Saccharomyces kluyveri*)等が挙げられる。酵母宿主への組み換えベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポーレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等を挙げることができる。

【0043】

他の真菌細胞の例は、糸状菌、例えばアスペルギルス、ニューロスボラ、フザリウム、またはトリコデルマに属する細胞である。宿主細胞として糸状菌を用いる場合、DNA構築物を宿主染色体に組み込んで組換え宿主細胞を得ることにより形質転換を行うことができる。DNA構築物の宿主染色体への組み込みは、公知の方法に従い、例えば相同組換えまたは異種組換えにより行うことができる。

【0044】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得

た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質を発現させることができる（例えば、*Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual*；及びカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、*Bio/Technology*, 6, 47(1988)等に記載）。

【0045】

バキュロウイルスとしては、例えば、ヨトウガ科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラファ・カリフォルニカ・ヌクレア・ポリヘドロシス・ウイルス(*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*)等を用いることができる。

昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda*の卵巣細胞であるSf9、Sf21〔バキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー(W. H. Freeman and Company)、ニューヨーク(New York)、(1992)〕、*Trichoplusia ni*の卵巣細胞であるHiFive(インビトロジエン社製)等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法又はリポフェクション法等を挙げることができる。

【0046】

上記の形質転換体は、導入されたDNA構築物の発現を可能にする条件下で適切な栄養培地中で培養する。形質転換体の培養物から、本発明の蛍光融合タンパク質を単離精製するには、通常のタンパク質の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明のタンパク質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常のタンパク質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)セファロース等のレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロ

マトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティーコロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

【0047】

(6) 細胞内のカルシウムイオンの濃度又は分布を測定する方法

本発明の方法においては、本発明のDNA構築物で形質転換またはトランسفエクトされた細胞を分光光度計または蛍光顕微鏡で測定し、光励起および光放出の走査として、液体培養中の細胞のスペクトル特性を決定することができる。これにより、該形質転換体中のカルシウムイオン濃度又は分布を測定することができる。

具体的には、本発明の融合蛍光タンパク質をコードするDNAを含むDNA構築物を細胞内へ導入することによりモニター可能となる。DNAの細胞への導入、細胞の培養、並びに蛍光タンパク質の検出の方法は、当業者に公知である。

本発明の蛍光タンパク質を検出するための簡単な方法は、蛍光光度計、すなわち本発明の蛍光タンパク質を励起するための光源および蛍光強度を測定するための測光計を備えた装置を使用するものである。蛍光光度計は周知であり、市販されている。また、蛍光顕微鏡を用いて蛍光を画像化することでカルシウムイオンの分布を測定することも可能である。

【0048】

(7) 本発明のキット

本発明によれば、本明細書に記載した蛍光タンパク質、融合蛍光タンパク質、当該タンパク質から成るカルシウムイオン指示薬、DNA、組み換えベクター又は形質転換体から選択される少なくとも1種以上を含むことを特徴とする、カルシウムイオンを測定するためのキットが提供される。本発明のキットは、それ自体既知の通常用いられる材料及び手法で調製することができる。

蛍光タンパク質又はDNAなどの試薬は、適当な溶媒に溶解することにより保存に適した形態に調製することができる。溶媒としては、水、エタノール、各種緩衝液などを用いることができる。

以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限

定されるものではない。

【0049】

【実施例】

(A) 材料および方法

(A-1) 遺伝子構築

cpEYFP (V68L/Q69K) のcDNAを3回のPCRにより構築した。まず、PstI部位を含む順方向プライマーと、ペプチドリンカー-GGSGGをコードする逆方向プライマーとを用いて、EYFP (V68L/Q69K) (Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R. & Tsien, R. Y. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 2135-2140) の3'部分のcDNAを増幅した。次に、ペプチドリンカー-GGSGGと、それぞれ5'および3'末端までのKpnI部位をコードする配列を用いて、EYFP (V68L/Q69K) の5'部分のcDNAを増幅した。最後に、最初のPCR断片および二番目のPCR断片の混合物を鋳型として用いて、PstIおよびKpnI部位を含有するプライマーにより、cpEYFP (V68L/Q69K) の完全なcDNAを増幅した。制限処理した産物を、pRSET_B (Invitrogen) のPstI/KpnI部位にインフレームでクローニングし、cpEYFP (V68L/Q69K) / pRSET_Bを得た。次に、5' BamHIと3' PstI部位、ならびに5' KpnIと3' EcoRI部位をそれぞれ含むプライマーを用いて、M13およびCaMをコードするcDNAを増幅した。制限処理したPCR断片をpRSET_B中のcpEYFP (V68L/Q69K) 遺伝子の5'および3'末端に連結して、細菌発現用のペリカム (pericam) の構築物を作製した。既報の通り (Sawano, A. & Miyawaki, A. (2000) Nucleic Acids Res. 28, e78)、リンカーの改変とcpEYFP (V68L/Q69K) 中の148および203位での部位特異的突然変異誘発を実施することにより、フラッシュ (flash) ペリカム (配列表の配列番号1)、レシオメトリック (ratiometric) ペリカム (配列表の配列番号2) およびインバース (inverse) ペリカム (配列表の配列番号3) を作製した。ペリカム遺伝子の5'末端をPCRで改変して、HindIII部位とその後にコザックコンセンサス配列 (CCACCATG) を導入した。該ペリカムをコードするHindIII/EcoRI断片を哺乳動物発現ベクター-pcDNA3 (Invitrogen) にサブクローニングした。M13- EYFP (V68L/Q69K) (145-238) およびEYFP (V68L/Q69K) (1-144) -CaMをコードするcDNAをフラッシュペリカムcDNAから取得し、pcDNA3にクローニングした。シトクロムcオキシダーゼ

ゼのサブユニットIVのN末端の12アミノ酸プレ配列をコードする配列 (Rizzuto, R., Simpson, A. W., Brini, M. & Pozzan, T. (1992) *Nature* 358, 325-327) を用いて、レシオメトリックペリカムcDNAの5'末端を、また、核局在化シグナル : PKKKRKVEDAを用いてその3'末端をそれぞれ伸長することにより、レシオメトリックペリカムmtおよびレシオメトリックペリカムnuを取得した。

【0050】

(A-2) タンパク質発現およびin vitro分光測定

既報の通り (Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J.A., Ikura, M. & Tsien, R. Y. (1997) *Nature* 388, 882-887) 、N末端にポリヒスチジンタグを有する組換え蛍光タンパク質を大腸菌 (JM109(DE3)) において発現させ、精製後、分光測定により解析した。

【0051】

(A-3) pHおよびCa²⁺滴定

既報の通り (Ormo, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y. & Remington, S. J. (1996) *Science* 273, 1392-1395) 、pH 4～12.5に調整した一連の緩衝液を用いて、pH滴定を実施した。0,0' -ビス (2-アミノエチル) エチレングリコール-N, N, N', N' -四酢酸 (EGTA) 、N-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン-N, N', N' -三酢酸 (EDTA-OH) またはニトリロ三酢酸 (NTA) を用いて調製したCa²⁺非含有緩衝液およびCa²⁺飽和緩衝液で相互に希釈することにより、Ca²⁺滴定を実施した。

【0052】

(A-4) 哺乳動物発現および画像化

Superfect (QIAGEN) を用いたcDNAトランスフェクションの2又は3日後に、MetaFluor/MetaMorph 4.0ソフトウェア (Universal Imaging) で制御されるMicro Max-1300Y/HSインターラインCCDカメラ (Roper scientific Inc.) を用いて、オリンパスIX-70上にHBSS緩衝液中のHeLa細胞を25℃で画像化した。フラッシュペリカム、インバースペリカムおよびスプリットペリカムによる単一波長画像化には、475DF35励起フィルター、505DRLP二色性ミラー、及び、HQ525/50発光フィルターを用いた。レシオメトリックペリカムによる二波長励起画像化には、フィル

ターチェンジャー（ラムダ10-2、Sutter Instruments）により切換えられる2つの励起フィルター（480DF10および410DF10）、505DRLP-XR二色性ミラー、及び535DF25発光フィルターを用いた。アルゴンイオンレーザー（Omnichrome、Melles Griot）を用いたFluoview FV500共焦点レーザー走査型顕微鏡（Olympus）を用いて、共焦点画像を実現した。

【0053】

(B) 結果および考察

(B-1) Ca^{2+} 感受性サーキュラーパーミュテーション化GFP変異体の構築

YFP変異体であるEYFP(V68L/Q69K) (Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R. & Tsien, R. Y. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 2135-2140) にサーキュラーパーミュテーションを施した。元のNおよびC末端を、ペントペプチドリンクカーグググを介して連結することにより、Y145およびN144を、それぞれ新しいNおよびC末端にした（図1）。N末端に結合したヘキサヒスチジンタグ（His6タグ）を用いて、サーキュラーパーミュテーション化YFP（cpEYFP(V68L/Q69K)）を大腸菌で発現させ、His6タグを用いて精製した。特に記載のない限り、精製したタンパク質の全てのスペクトルをpH7.4で測定した。cpEYFP(V68L/Q69K)の吸光スペクトルは420nmに主要なピークがあり、500nm付近で小さなながらかなピークを有することを示した（図2 A）。これは、514nmに主ピークを有する元のEYFP(V68L/Q69K)（図2 A、Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R. & Tsien, R. Y. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 2135-2140）とは対照的である。このブルーシフトは、発色団がcpEYFP(V68L/Q69K)においてプロトン化していることを示唆している。励起スペクトルは、WT-GFPの二峰性励起スペクトル（Tsien, R. Y. (1998) Annu. Rev. Biochem. 67, 509-44）を暗示する417nmおよび506nmに2つのピークを有していた（図2 B）。420nm付近で吸光するcpEYFP(V68L/Q69K)のプロトン化種は蛍光を発するのに対し、大部分のYFPのプロトン化種は蛍光を発しない（Tsien, R. Y. (1998) Annu. Rev. Biochem. 67, 509-44）。

【0054】

最初の試みでは、CaMのC末端およびM13のN末端を、cp EYFP(V68L/Q69K)のN末端およびC末端にそれぞれ連結した。しかし、このキメラタンパク質は、 Ca^{2+} に

対して応答を示さなかった。次に、CaMおよびM13の位置を交換した。すなわち、トリペプチドリンカーSAGを介してM13のC末端に、また、GTGリンカーを介して、3番目のCa²⁺結合ループ内に保存された二座配位子グルタメートからグルタミンへのE104Q変異を含むCaM¹³のN末端に、cpEYFP(V68L/Q69K)を融合した（図1）。CaMのN末端とM13のC末端はそれらの複合体において50Å離れているが（Ikura, M., Clore, G. M., Gronenborn A. M., Zhu, G., Klee, C. B. & Bax, A. (1992) Science 256, 632-638）、キメラタンパク質は蛍光性でCa²⁺感受性を示した。サーキュラーパーミュテーション化YFPおよびCaMを有するタンパク質を「ペリカム（pericam）」と命名した。485nmで励起した場合、Ca²⁺結合ペリカムは、520nmで発光ピークを示し、Ca²⁺を含まないペリカムよりも3倍明るかった。これとは対照的に、cpEYFP(V68L/Q69K)の吸光スペクトルおよび蛍光スペクトルはいずれもCa²⁺に対して感受性がなかった。

【0055】

さらに大きなダイナミックレンジをもつペリカムを取得するために、プロトネットワークに関与する数個のアミノ酸を最適化した。Tyrの代わりにHis203への置換によってダイナミックレンジが有意に改善された。「フラッシュペリカム」と称するこの新しいペリカムは（図1）、Ca²⁺が存在する場合蛍光が8倍増加した（図3D）。37°Cにおいて改良したフォールディングをもたらす2つの変異（V163AおよびS175G）を用いて、フラッシュペリカムを細胞内Ca²⁺の単一波長指示薬として作用するように設計した。Ca²⁺の不在下で、フラッシュペリカムは、cpEYFP(V68L/Q69K)と類似した吸光スペクトルを示した（図3A、破線）。Ca²⁺が飽和すると、400nmピークが減少して490nmの吸光ピークが増大した（図3A、実線）。これは、Ca²⁺-CaMとM13ペプチドとの会合により発色団のイオン化が起り、その結果、pH滴定曲線の左方シフトが起こったことを示している（図3G）。pHが発色団をイオン化するのに十分なほど高い場合には、Ca²⁺結合フラッシュペリカム（pH=9）は、Ca²⁺を含まない場合（pH>10）の約2倍明るい。従って、pH滴定性以外にも、CaMとM13との間の相互作用は、発色団に直接的な立体作用を及ぼす可能性があり、そのイオン化状態を変更したり、または面外変形を低減して、無放射性緩和の増強を引き起こす可能性がある。フラッシュペリカム

とのCa²⁺結合によって量子収量が数倍増加すると共に、490nmにおけるモル吸光係数が増加したため（表1）、後者の可能性が高い。図3 GのpH滴定曲線から、Ca²⁺結合フラッシュペリカムが、アルカリ抑制（alkali-quenched）された（pH >10）ことが示され、不完全な β -can構造の崩壊が示唆される。

【0056】

【表1】

Name	critical mutation ^a	Ca ²⁺	$\lambda_{abs} (\epsilon)$ ^{b,e}	$\lambda_{em} (\Phi)$ ^{c,e}	Kd for Ca ²⁺ (n) ^{d,e}
flash-pericam	T203H	-	403 (26.8) 488 (6.3)	514 (0.04)	0.7 μ M (0.7)
		+	410 (21.2) 494 (16.9)	514 (0.20)	
ratiometric-pericam	H148D, T203F	-	418 (24.1) 494 (4.1)	511 (0.30)	1.7 μ M ^f (1.1)
		+	415 (20.5) 494 (10.3)	517 (0.18)	
inverse-pericam	H148T, T203F	-	503 (59.0)	515 (0.64)	0.2 μ M (1.0)
		+	490 (44.0)	513 (0.44)	

【0057】

表1は、フラッシュペリカム、インバースペリカム、およびレシオメトリックペリカムのスペクトル特性を示す。

a : EYFP(V68L/Q69K)の一次配列からの置換は、置換されるアミノ酸の一文字表記、配列中の位置、そして置換の一文字表記として示す。

b : λ_{abs} は、ナノメートル単位での吸光スペクトルのピークであり、括弧内のeは、 $10^3 M^{-1} cm^{-1}$ でのモル吸光係数である。

c : λ_{em} は、ナノメートル単位での発光スペクトルのピークであり、括弧内の Φ は、蛍光量子収率である。

d : Ca^{2+} のKd値は、図3における適合曲線から推定した。括弧内のnはヒル(Hill)係数である。

e : これらの特性は、50 mM HEPES/KOH pH7.4で測定した。

f : この値は、 $K' d$ 値(見掛けのKd値)を示す。

【0058】

ほとんどのYFPは、位置203にチロシンまたはヒスチジンを有し、400nm付近で吸光する非蛍光性プロトン化種を含む (Tsien, R. Y. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* 67, 509-44)。また、フラッシュペリカムを400nm付近で励起させた場合には、蛍光はほぼ検出不可能だった。これに対し、YFPの位置203におけるフェニルアラニンは、プロトン化種を蛍光性にすることが示されている。例えば、400nmでのPhe203を有するYFPの励起は、455nmに主な発光ピークを発生させた (Dickson, R. M., Cubitt, A. B., Tsien, R. Y. & Moerner, W. E. (1997) *Nature* 388, 355-358)。二波長励起レシオメトリック Ca^{2+} 指示薬を目的として、フラッシュペリカムにPhe203を導入した。リンカーと数個のアミノ酸が、タンパク質フォールディングと Ca^{2+} 感受性の最適化に重要であることが判明した。多数の構築物を試験した後、H203F、H148D、F46Lを導入し、CaMの前のグリシンを欠失させ、元のN末端とC末端の間にあるGGS GGリinkerをVDGGSGGTGで置換することにより、「レシオメトリックペリカム」をフラッシュペリカムから誘導した(図1)。フラッシュペリカムでみられたように、 Ca^{2+} 結合は、レシオメトリックペリカムにおける発色団のイオン化を促進していた。従って、レシオメトリックペリカムは、フラッシュペリカムと同様の吸光スペクトルの Ca^{2+} 依存性変化を示し(図3B)、pH滴定曲線は、 Ca^{2+} により左方にシフトした(図3H)。しかし、フラッシュペリカムとは対照的に、レシオメトリックペリカムは、415nmおよび494nmにピ

ークをもつ二峰励起スペクトルを有しており（図3 E）、494 nmおよび415nm光で励起した場合に発光する緑色蛍光（511～517nm）の相対強度は、Ca²⁺飽和と、Ca²⁺非含有形態とでは約10倍変化が見られた（図3 E）。励起比（494/415）から、見掛けの解離定数（K' d）が1.7 μMおよびHill定数が1.1の、単相性Ca²⁺依存性が示された（図3 K）。

【0059】

レシオメトリックペリカムを準ランダム突然変異誘発に供した結果、D148Tの置換を有する興味深いタンパク質をみいだした（図1）。フラッシュペリカムとは対照的に、500nmで励起した場合に発光する緑色蛍光（513～515nm）は、Ca²⁺により15%まで減少した（図3 F）。このタンパク質を「インバースペリカム」と命名した。インバースペリカムへのCa²⁺の結合が発色団のプロトン化を促進した可能性があったが、下記の結果からそうではないことが判明した。pH7.4において、Ca²⁺イオンだけが、吸光スペクトルのピークを503nmから490nmにブルーシフトさせ、400nm付近の小さな丘状曲線は未変化であった（図3 C）。すなわち、Ca²⁺結合は発色団のプロトン化状態に影響を与えたかった。また、Ca²⁺結合インバースペリカムおよびCa²⁺非含有インバースペリカムの両方を同様にpH滴定したが、イオン化状態（pH>8）では、Ca²⁺非含有タンパク質は、Ca²⁺結合形態より7倍明るかった（図3 I）。実際、量子収率は、Ca²⁺結合により30%減少した（表1）。これらの結果は、蛍光強度の変化は、発色団に対するCa²⁺関連の構造変化の直接的作用によるものと説明できることを示唆している。

【0060】

（B-2）ペリカムを発現するHeLa細胞における [Ca²⁺]_i 画像化：

各ペリカムをHeLa細胞にトランスフェクトした場合、蛍光はサイトゾルコンパートメントおよび核コンパートメント全体に均質に分布するが、核孔を通過することのできる44kDaのタンパク質であると予想されることから、核からは排除されない（例えば、図5 Aを参照）。従って、ペリカムは、細胞内遊離Ca²⁺濃度（[Ca²⁺]_i）を追跡することができる。図4 A、4 B および4 Cは、フラッシュペリカム、レシオメトリックペリカムおよびインバースペリカムをそれぞれ発現するHeLa細胞における、受容体刺激型 [Ca²⁺]_i 振動を示す。各々の場合におい

て、応答は、大きな棘状波で始まり、正弦波となった後、一時的な棘状波に変わり、なだらかに振動数が低下した。

【0061】

単一波長指示薬（フラッシュペリカムおよびインバースペリカム）と比較して、レシオメトリックペリカムは、定量的 Ca^{2+} 画像化を可能にし、これにより、指示薬濃度および細胞の厚み又は運動により生じるアーティファクトを相殺することができる。 Ca^{2+} イオノホアの存在下で、高濃度（5mM）の細胞外 Ca^{2+} の適用、次いで、BAPTA-AMおよびEGTAの適用により、*in situ*較正用の最大比および最小比（それぞれ、 R_{\max} および R_{\min} ）が得られた（図4 Bの上部）。最初の棘状波の振幅は約3 μM であったが、続く棘状波の振幅は、1 μM を下回った。相対的に弱い Ca^{2+} 親和性のために、一般の二波長励起レシオメトリック Ca^{2+} 指示薬であるura-2と比較して、より正確な棘状波振幅の定量化が可能になる。

【0062】

インバースペリカムの時間経過（図4 C）は、フラッシュペリカムの対称画像であると考えられる（図4 A）。しかし、インバースペリカムは、比較的により持続した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加を示した（図4 C）。これは、インバースペリカムが、フラッシュペリカムより Ca^{2+} に対する親和力が高く、その K_d 値はそれぞれ0.2 μM および0.7 μM であった（図3Jおよび3L）という知見と一致する。インバースペリカムの利点の一つは、 Ca^{2+} 非含有形態が、pH7.4において高いモル吸光係数および量子収率を有することであり（表1）、これらは、enhanced GFPにほぼ匹敵する（Tsien, R. Y. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* 67, 509-44）。従って、 Ca^{2+} により減光する異常な特性にもかかわらず、インバースペリカムの使用により、十分なS/N比で、 Ca^{2+} 画像化が可能になる。

【0063】

ペリカムの開発過程では、哺乳動物細胞における37°Cでのフォールディング効率も重要な因子であった。インバースペリカムおよびレシオメトリックペリカムが、温度とは無関係に効率的にフォールディングすることができるのに対し、フラッシュペリカムは、28~30°Cで良好に生成される。

【0064】

(B-3) タンパク質ヘテロ二量体化のモニター:

サーキュラーパーミュテーション化GFP変異体が分子間会合を検出できるかどうかは興味深い。この可能性を調べるために、EYFP(V68L/Q69K)の元のN末端とC末端との間のリンカーにおいてフラッシュペリカムを分割した(図1)。2つのタンパク質(「スプリットペリカム」)を、HeLa細胞中で共発現させた。GFPの発色団は、トリペプチド65~67から成るが、その形成には完全な β -can構造(Tsien, R. Y. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* 67, 509-44)が必要である。従って、2つのペプチド鎖が $[Ca^{2+}]_i$ の基底レベルでどれくらい効率的に会合するか、また、成熟発色団がどの程度形成されるかは明らかではない。これにも拘わらず、スプリットペリカムは、CaMとM13ペプチドとの間の可逆的会合をモニターすることができた。時間経過プロフィールは、ATPもしくはヒスタミンにより引き起こされる $[Ca^{2+}]_i$ 振動を生じた(図4D)。しかし、スプリットペリカムは確実な Ca^{2+} 指示薬として使用することはできなかった。CaMおよびM13ペプチドは分離しているため、これらは細胞中の未標識CaMおよびCaM結合タンパク質と交差反応していた。*in vitro*実験から、フラッシュペリカムにおいて融合したCaMとM13は互いに優先的に相互作用することが示された。

【0065】

(B-4) Ca^{2+} イオンに対する核膜の透過性:

サイトゾルの Ca^{2+} 濃度($[Ca^{2+}]_c$)とは無関係に、核内 Ca^{2+} 濃度($[Ca^{2+}]_n$)が調節されるかどうかは不明である(Malviya, A. N. & Rogue, P. J. (1998) *Cell* 92, 17-23)。合成蛍光キレート剤を用いて、 $[Ca^{2+}]_n$ および $[Ca^{2+}]_c$ の比較測定が実施されている。しかし、サイトゾルシグナルには、キレート剤がコンパートメント化される小胞体等の細胞内小器官からのシグナルが混入していることが多い(Brown, G.R., Kohler, M & Berggren, P. O. (1997) *Biochem. J.* 325, 771-778)。 Ca^{2+} 感受性発光タンパク質であるエクオリンは、核およびサイトゾル中に特異的に局在化しているが(Badminton, M. N., Campbell, A. K. & Rembold, C. M. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 31210-31214; 及びBrini, M., Murgia, M., Pasti, L., Picard, D., Pozzan, T. & Rizzuto, R. (1993) *EMBO J.* 12, 4813-4819)、個々の細胞における $[Ca^{2+}]_n$ および $[Ca^{2+}]_c$ を画像化す

るのは難しいことが判明した。Ca²⁺波の伝播を検定するために、HeLa細胞をフラッシュペリカムcDNAを用いてトランスフェクトした後、アルゴンイオンレーザーを備えた高速共焦点線走査型顕微鏡を用いてシグナルを観測した。図5 Aは、フラッシュペリカムを発現する細胞の光断面画像を示す。ここで、フラッシュペリカムは、前述した通り同じタンパク質濃度で、サイトゾルおよび核全体に常に分布していた。従って、フラッシュペリカムを使用して、Ca²⁺緩衝作用の相違とは無関係に、2つのCa²⁺濃度を比較することができた。ヒスタミンにより刺激され、線走査により検出されるCa²⁺伝播の典型的なパターンを図5 Bに示す。Ca²⁺波は、図5 Aに示した線に沿って移動した。図5 Cは、1 μMのヒスタミン浸漬後の $[Ca^{2+}]_n$ および $[Ca^{2+}]_c$ の、時間経過による測定を示す。 $[Ca^{2+}]_n$ と $[Ca^{2+}]_c$ との間に、時間経過によるプロフィールに明白な相違はみられなかった。ビデオー速度走査型2光子励起蛍光顕微鏡 (Fan, G. Y., Fujisaki, H., Miyawaki, A., Tsay, R. K., Tsien, R.Y. & Ellisman, M. H. (1999) Biophys. J. 76, 2412-2420) と、蛍光Ca²⁺指示薬であるカメレオン (ameleon) (Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J.A, Ikura, M. & Tsien, R. Y. (1997) Nature 388, 882-887) を用いて行った実験からも、同様の結果が得られた。

【0066】

(B-5) ミトコンドリアにおける遊離Ca²⁺動態力学：

ミトコンドリアは、細胞のCa²⁺シグナリングにおける活性な関与因子である。ミトコンドリアは、細胞内貯蔵物からのCa²⁺の侵入または放出により生じる高濃度のCa²⁺のサイトゾルミクロドメインからCa²⁺を分離させる。 $[Ca^{2+}]_c$ の増加がどのようにしてミトコンドリアに中継されるかを調べることは興味深いが、無傷の単細胞での $[Ca^{2+}]_c$ および $[Ca^{2+}]_m$ (ミトコンドリアにおける遊離Ca²⁺濃度) の同時測定の成功はごく少数の例しかない (Ricken, S., Leipziger, J., G reger, R. & Nitschke, R. (1998) J. Biol. Chem. 273, 34961-34969)。合成蛍光キレート剤を示差的にターゲッティングするのは困難である。従って、測定には、パッチクランプ法を使用している。例えば、ミトコンドリア中の透過性カチオンrhod-2アセトキシメチルエステルの蓄積後、デキストランと結合した他の

Ca^{2+} 染料を全細胞透析によりローディングしたが (Babcock, D., Herrington, J., Goodwin, P. C., Park, Y. B. & Hille, B. (1997) *J. Cell Biol.* 136, 833-844) 、ミトコンドリアは天然サイトゾルには浸漬しなかった。これに対し、エクオリンは容易にターゲッティングされるが (Rutter, G. A. Burnett, P., Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M., Pozzan, T., Tavare, J. M. & Denton, R. M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5489-5494) 、セレンテラジン (colelenterazine) の組込みを必要とし、 Ca^{2+} により不可逆的に消費される。しかも、そのルミネセンスが生成する光子は1分子当たり1個に満たないため、画像化が困難である。

【0067】

本実施例では、HeLa細胞において、ミトコンドリアおよび核にターゲッティングしたレシオメトリックペリカムを用いて、それぞれ $[\text{Ca}^{2+}]_m$ および $[\text{Ca}^{2+}]_n$ を測定した。HeLa細胞内で Ca^{2+} シグナルがサイトゾルから核へと自由に通過するという知見に基づき、ミトコンドリア外 Ca^{2+} シグナルとして、 $[\text{Ca}^{2+}]_n$ を測定した。これによって、空間的に十分離れたミトコンドリア内およびミトコンドリア外の Ca^{2+} シグナルの同時観測を実施することが可能になる。図6Aは、1 μM ヒスタミンによる灌流から0、5、10および65秒後のHeLa細胞の4つのスナップショットを示す。0秒画像に表示した2つのスポットで測定された励起比(480/410)は重なっている(図6B)。 $[\text{Ca}^{2+}]_n$ の持続的増加が起つたが、これには、一過性かつ同調した $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 増加が伴つた。しかし、 $[\text{Ca}^{2+}]_m$ のピークは、既報の通り (Ricken, S., Leipziger, J., Greger, R. & Nitschke, R. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 34961-34969) 、 $[\text{Ca}^{2+}]_n$ より5~10秒遅延した。ホールセルパッチ法で $[\text{Ca}^{2+}]_m$ と $[\text{Ca}^{2+}]_n$ とを比較した以前の実験では、 $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 低下の遅延が報告されているが、本実施例では、 $[\text{Ca}^{2+}]_m$ の回復はかなり早く、無傷細胞を用いた別の実験結果と一致した (Ricken, S., Leipziger, J., Greger, R. & Nitschke, R. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 34961-34969)。従つて、ミトコンドリアからの Ca^{2+} 流出は、全細胞透析で消失するサイトゾル因子により調節される可能性がある。また、図6Aから、65秒画像の矢印が示すように、下降期の間、一部のミトコンドリアが他より多くの Ca^{2+} を一過性に取込んだ

ことがわかる。 $[Ca^{2+}]_m$ の局所的増加は、繰り返し観測された。ミトコンドリアにターゲッティングされたレシオメトリックペリカムだけを含む2つのHeLa細胞（図6C）では、高 $[Ca^{2+}]_m$ を示す単一のミトコンドリアがはっきりと画像化された（矢印で示す）。 $[Ca^{2+}]_m$ 上昇はそれぞれ約10秒間持続した。個々の細胞におけるミトコンドリア集団のこのような異なる挙動は、エクオリンを用いた $[Ca^{2+}]_m$ の細胞小器官画像化により明らかにされた（Montero, M. Alonso, M. T., Carnicero, E., Cuchillo-Ibanez, I., Albinos, A., Garcia, A. G., Garcia-Sancho, J. & Alvarez, J. (2000) *Nat. Cell Biol.* 2, 57-61）。

【0068】

（B-6）ペリカムと他の遺伝子をコード化可能な Ca^{2+} 指示薬の比較：

2種の遺伝子的にコード化可能な蛍光 Ca^{2+} 指示薬が既に報告されている。すなわち、カメレオン（Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J.A., Ikura, M. & Tsien, R. Y. (1997) *Nature* 388, 882-887）およびカムガルー（camgaroo）（Baird, G. S., Zacharias, D.A. & Tsien, R. Y. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11241-11246）である。カメレオンは、色が異なる2種のGFP変異体を使用してFRETを用いる二波長測光型レシオメトリック Ca^{2+} 指示薬である。カメレオンと比較して、レシオメトリックペリカムは、 Ca^{2+} に対してより大きな応答を示す。HeLa細胞内部のレシオメトリックペリカムの R_{min} に対する R_{max} の10倍比は、*in vitro*で得られた励起比（494/415）の変化と一貫しており、改良した黄色カメレオン（Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R. & Tsien, R. Y. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 2135-2140）の R_{max} / R_{min} の2倍比よりはるかに大きい。レシオメトリックペリカムは、比較的高いモル吸光係数および量子収率、及び37°Cでの効率的フォールディング能力を示すことから、このレシオメトリックペリカムも十分なシグナル／ノイズ比を保証する。本実施例では、ミトコンドリアにターゲッティングするレシオメトリックペリカムにより、単一のミトコンドリア中の $[Ca^{2+}]_m$ をモニターすることができた。

【0069】

カムガルーは、中央部位にカルモジュリンの挿入を有する Ca^{2+} 感受性EYFPであ

り、フラッシュペリカム同様に、 Ca^{2+} の飽和時に7倍明るくなる。しかし、その Ca^{2+} に対する親和力が低い ($K_d = 7 \mu M$) ために、カムガルーは、2~3 μM までのヒスタミン誘導型 $[Ca^{2+}]_i$ 荘状波を十分に検出することができない。これとは対照的に、フラッシュペリカムは、 Ca^{2+} に対して十分に高い親和力 ($K_d = 0.7 \mu M$) を有することから、 $[Ca^{2+}]_i$ の生理学的变化を感知することができる。

【0070】

本実施例により、発色団近傍のアミノ酸に精妙な変異を導入するだけで、ペリカムの Ca^{2+} 依存性挙動を著しく改変できることが判明した。ほとんどの場合、ペリカムはランダムに突然変異させたが、合理的な突然変異もいくつかあった。一例は、残基203におけるチロシンのフェニルアラニンへの置換 (Y203F) により、レシオメトリックペリカムを作製したことである。3つのペリカムに関する結晶学的実験により、異なる挙動を有するペリカム、もしくはその他cpGFPに基づくバイオセンサーを設計する上でさらに多くの情報が得られるかもしれない。GFPのプロトンネットワークについての理解をさらに深めることにより、cpGFPは、FRRET技術を補う潜在的に有力な手段となる可能性がある。

【0071】

【発明の効果】

本発明により、カルシウムイオンに感受性のある新規な蛍光タンパク質、特に37°Cにおいてカルシウムイオン濃度を定量化するための指示薬として使用できる蛍光タンパク質を提供することが可能になった。

【0072】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> Fluorescent proteins

<130> A11060MA

<160> 5

【0073】

<210> 1

<211> 1278

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Recombinant DNA

<400> 1

atg aag agg cgc tgg aag aaa aac ttc att gcc gtc agc gct gcc aac 48

Met Lys Arg Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn

1

5

10

15

cgg ttc aag aag atc tcc agc tcc ggg gca ctg ggg tct gca ggc tac 96

Arg Phe Lys Lys Ile Ser Ser Ser Gly Ala Leu Gly Ser Ala Gly Tyr

20

25

30

aac agc cac aac gtc tat atc atg gcc gac aag cag aac ggc atc 144

Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile

35

40

45

aag gcc aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc ggc gtg cag 192

Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Gly Val Gln

50

55

60

ctc gcc gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc ccc gtg 240

Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val

65

70

75

80

ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg agc cac cag tcc gcc ctg agc aaa 288

Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser His Gln Ser Ala Leu Ser Lys

85

90

95

gac ccc aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc 336

Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr

100

105

110

gcc gcc ggg atc act ctc ggc atg gac gag ctg tac aag ggt ggc agc 384

Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Ser

115	120	125
ggt ggc atg gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc 432		
Gly Gly Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro		
130	135	140
atc ctg gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg 480		
Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val		
145	150	155
tcc ggc gag ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag 528		
Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys		
165	170	175
ttc atc tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg 576		
Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val		
180	185	190
acc acc ttc ggc tac ggc ctg aag tgc ttc gcc cgcc tac ccc gac cac 624		
Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His		
195	200	205
atg aag cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc 672		
Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val		
210	215	220
cag gag cgcc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgcc 720		
Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg		
225	230	235
gcc gag gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg aac cgcc atc gag ctg 768		
Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu		
245	250	255
aag ggc atc gac ttc aag gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg 816		
Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu		
260	265	270
gag tac aac ggt acc ggg gac caa ctg aca gaa gag cag att gca gag 864		

Glu Tyr Asn Gly Thr Gly Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu
 275 280 285
 ttc aaa gaa gcc ttc tca tta ttc gac aag gat ggg gac ggc acc atc 912
 Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile
 290 295 300
 acc aca aag gaa ctt ggc acc gtt atg agg tcg ctt gga caa aac cca 960
 Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro
 305 310 315 320
 acg gaa gca gaa ttg cag gat atg atc aat gaa gtc gat gct gat ggc 1008
 Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly
 325 330 335
 aat gga acg att tac ttt cct gaa ttt ctt act atg atg gct aga aaa 1056
 Asn Gly Thr Ile Tyr Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys
 340 345 350
 atg aag gac aca gac agc gaa gag gaa atc cga gaa gca ttc cgt gtt 1104
 Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val
 355 360 365
 ttt gac aag gat ggg aac ggc tac atc agc gct gct cag tta cgt cac 1152
 Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Gln Leu Arg His
 370 375 380
 gtc atg aca aac ctc ggg gag aag tta aca gat gaa gaa gtt gat gaa 1200
 Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu
 385 390 395 400
 atg ata agg gaa gca gat atc gat ggt gat ggc caa gta aac tat gaa 1248
 Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu
 405 410 415
 gag ttt gta caa atg atg aca gca aag taa 1278
 Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys
 420 425

【0074】

<210> 2

<211> 1284

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Recombinant DNA

<400> 2

atg aag agg cgc tgg aag aaa aac ttc att gcc gtc agc gct gcc aac 48

Met Lys Arg Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn

1

5

10

15

cgg ttc aag aag atc tcc agc tcc ggg gca ctg ggg tct gca ggc tac 96

Arg Phe Lys Lys Ile Ser Ser Ser Gly Ala Leu Gly Ser Ala Gly Tyr

20

25

30

aac agc gac aac gtc tat atc atg gcc gac aag cag aag aac ggc atc 144

Asn Ser Asp Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile

35

40

45

aag gcc aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc ggc gtg cag 192

Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Gly Val Gln

50

55

60

ctc gcc gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc ccc gtg 240

Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val

65

70

75

80

ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg agc ttc cag tcc gcc ctg agc aaa 288

Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Phe Gln Ser Ala Leu Ser Lys

85

90

95

gac ccc aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc 336

Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr

100

105

110

gcc gcc ggg atc act ctc ggc atg gac gag ctg tac aag gtc gac ggt 384
 Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Val Asp Gly
 115 120 125
 ggc agc ggt ggc acc ggt gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg 432
 Gly Ser Gly Gly Thr Gly Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly
 130 135 140
 gtg gtg ccc atc ctg gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc cac aag 480
 Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys
 145 150 155 160
 ttc agc gtg tcc ggc gag ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc aag ctg 528
 Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu
 165 170 175
 acc ctg aag ctc atc tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc 576
 Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro
 180 185 190
 acc ctc gtg acc acc ttc ggc tac ggc ctg aag tgc ttc gcc cgc tac 624
 Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr
 195 200 205
 ccc gac cac atg aag cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc gaa 672
 Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu
 210 215 220
 ggc tac gtc cag gag cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac 720
 Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr
 225 230 235 240
 aag acc cgc gcc gag gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg aac cgc 768
 Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg
 245 250 255
 atc gag ctg aag ggc atc gac ttc aag gag gac ggc aac atc ctg ggg 816
 Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly

260	265	270	
cac aag ctg gag tac aac ggt acc gac caa ctg aca gaa gag cag att 864			
His Lys Leu Glu Tyr Asn Gly Thr Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile			
275	280	285	
gca gag ttc aaa gaa gcc ttc tca tta ttc gac aag gat ggg gac ggc 912			
Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly			
290	295	300	
acc atc acc aca aag gaa ctt ggc acc gtt atg agg tcg ctt gga caa 960			
Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln			
305	310	315	320
aac cca acg gaa gca gaa ttg cag gat atg atc aat gaa gtc gat gct 1008			
Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala			
325	330	335	
gat ggc aat gga Acg att tac ttt cct gaa ttt ctt act atg atg gct 1056			
Asp Gly Asn Gly Thr Ile Tyr Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala			
340	345	350	
aga aaa atg aag gac aca gac agc gaa gag gaa atc cga gaa gca ttc 1104			
Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe			
355	360	365	
cgt gtt ttt gac aag gat ggg aac ggc tac atc agc gct gct cag tta 1152			
Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Gln Leu			
370	375	380	
cgt cac gtc atg aca aac ctc ggg gag aag tta aca gat gaa gaa gtt 1200			
Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val			
385	390	395	400
gat gaa atg ata agg gaa gca gat atc gat ggt gat ggc caa gta aac 1248			
Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn			
405	410	415	
tat gaa gag ttt gta caa atg atg aca gca aag taa			1284

Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys

420

425

【0075】

<210> 3

<211> 1284

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Recombinant DNA

<400> 3

atg aag agg cgc tgg aag aaa aac ttc att gcc gtc agc gct gcc aac 48

Met Lys Arg Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn

1

5

10

15

cgg ttc aag aag atc tcc agc tcc ggg gca ctg ggg tct gca ggc tac 96

Arg Phe Lys Lys Ile Ser Ser Ser Gly Ala Leu Gly Ser Ala Gly Tyr

20

25

30

aac agc gac aac gtc tat atc atg gcc gac aag cag aag aac ggc atc 144

Asn Ser Asp Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile

35

40

45

aag gcc aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc ggc gtg cag 192

Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Gly Val Gln

50

55

60

ctc gcc gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc ccc gtg 240

Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val

65

70

75

80

ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg agc ttc cag tcc gcc ctg agc aaa 288

Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Phe Gln Ser Ala Leu Ser Lys

85

90

95

gac ccc aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc 336

Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr
 100 105 110
 gcc gcc ggg atc act ctc ggc atg gac gag ctg tac aag gtc gac ggt 384
 Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Val Asp Gly
 115 120 125
 ggc agc ggt ggc acc ggt gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg 432
 Gly Ser Gly Gly Thr Gly Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly
 130 135 140
 gtg gtg ccc atc ctg gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc cac aag 480
 Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys
 145 150 155 160
 ttc agc gtg tcc ggc gag ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc aag ctg 528
 Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu
 165 170 175
 acc ctg aag ctc atc tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc 576
 Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro
 180 185 190
 acc ctc gtg acc acc ttc ggc tac ggc ctg aag tgc ttc gcc cgc tac 624
 Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr
 195 200 205
 ccc gac cac atg aag cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc gaa 672
 Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu
 210 215 220
 ggc tac gtc cag gag cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac 720
 Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr
 225 230 235 240
 aag acc cgc gcc gag gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg aac cgc 768
 Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg
 245 250 255

atc gag ctg aag ggc atc gac ttc aag gag gac ggc aac atc ctg ggg 816
 Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly
 260 265 270
 cac aag ctg gag tac aac ggt acc gac caa ctg aca gaa gag cag att 864
 His Lys Leu Glu Tyr Asn Gly Thr Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile
 275 280 285
 gca gag ttc aaa gaa gcc ttc tca tta ttc gac aag gat ggg gac ggc 912
 Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly
 290 295 300
 acc atc acc aca aag gaa ctt ggc acc gtt atg agg tcg ctt gga caa 960
 Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln
 305 310 315 320
 aac cca acg gaa gca gaa ttg cag gat atg atc aat gaa gtc gat gct 1008
 Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala
 325 330 335
 gat ggc aat gga acg att tac ttt cct gaa ttt ctt act atg atg gct 1056
 Asp Gly Asn Gly Thr Ile Tyr Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala
 340 345 350
 aga aaa atg aag gac aca gac agc gaa gag gaa atc cga gaa gca ttc 1104
 Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe
 355 360 365
 cgt gtt ttt gac aag gat ggg aac ggc tac atc agc gct gct cag tta 1152
 Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Gln Leu
 370 375 380
 cgt cac gtc atg aca aac ctc ggg gag aag tta aca gat gaa gaa gtt 1200
 Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val
 385 390 395 400
 gat gaa atg ata agg gaa gca gat atc gat ggt gat ggc caa gta aac 1248
 Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn

405

410

415

tat gaa gag ttt gta caa atg atg aca gca aag taa

1284

Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys

420

425

【0076】

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: linker peptide

<400> 4

Gly Gly Ser Gly Gly

1

5

【0077】

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: linker peptide

<400> 5

Val Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr Gly

1

5

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、細菌および哺乳動物細胞における発現用ペリカムの構造および配列を示す。リンカーおよびアミノ酸置換の配列を、バーの上下にそれぞれ示す。His6は、ポリヒスチジンタグを；kzは、コザックコンセンサス配列を；nlsは核局在

化シグナルを；coxIVは、シトクロムcオキシダーゼサブユニットIVターゲッティングシグナル (Rizzuto, R., Simpson, A. W., Brini, M. & Pozzan, T. (1992) *Nature* 358, 325-327) をそれぞれ示す。

【図2】

図2の(A)は、EYFP(V68L/Q69K) (破線) およびcpEYFP(V68L/Q69K) (実線) の吸光スペクトルを示し、図2の(B)は530nm発光および485nm励起でそれぞれ記録したcpEYFP(V68L/Q69K)の蛍光励起(ex) および発光(em)スペクトルを示す。ここで、スペクトルはすべて、最大値1.0に正規化した。

【図3】

図3は、フラッシュペリカム(A、D、GおよびJ)、レシオメトリックペリカム(B、E、HおよびK)、ならびにインバースペリカム(C、F、IおよびL)のin vitro特性を示す。図3では、ペリカムの吸光スペクトル(A～C)、ならびに、蛍光励起および発光スペクトル(D～F)、514nm発光ピーク(G)、516nm発光ピーク(I)、ならびに、495/510の励起比における正規化振幅のpH依存性(H)を示す。(A)～(I)では、スペクトルおよびデータ点は、Ca²⁺イオンの存在下(実線)および不在下(破線)で得られた。(J)～(L)は、ペリカムのCa²⁺滴定曲線を示す。FIは蛍光強度を指す。

【図4】

図4は、フラッシュペリカム(A)、レシオメトリックペリカム(B)、インバースペリカム(C)およびスプリットペリカム(D)を発現するHeLa細胞における、受容体刺激により誘導される[Ca²⁺]_i一過性事象および振動を示す。サンプリング間隔は3～5秒である。(B)上部、480nm対410nmの励起比。右側の縦座標は、矢印線と矢先がそれぞれ示すR_{max}およびR_{min}を用いて、μM単位で[Ca²⁺]_iを較正する。下部、480nm励起(黒い線、左側の目盛)および410nm励起(灰色の線、右側の目盛)。

【図5】

図5の(A)は、フラッシュペリカムを発現するHeLa細胞の共焦点画像を示し、図5の(B)は、ヒスタミン誘発Ca²⁺伝播の(A)における縦線に沿った線走査画像を示し、図5の(C)は、サイトゾルおよび核におけるCa²⁺シグナルの時

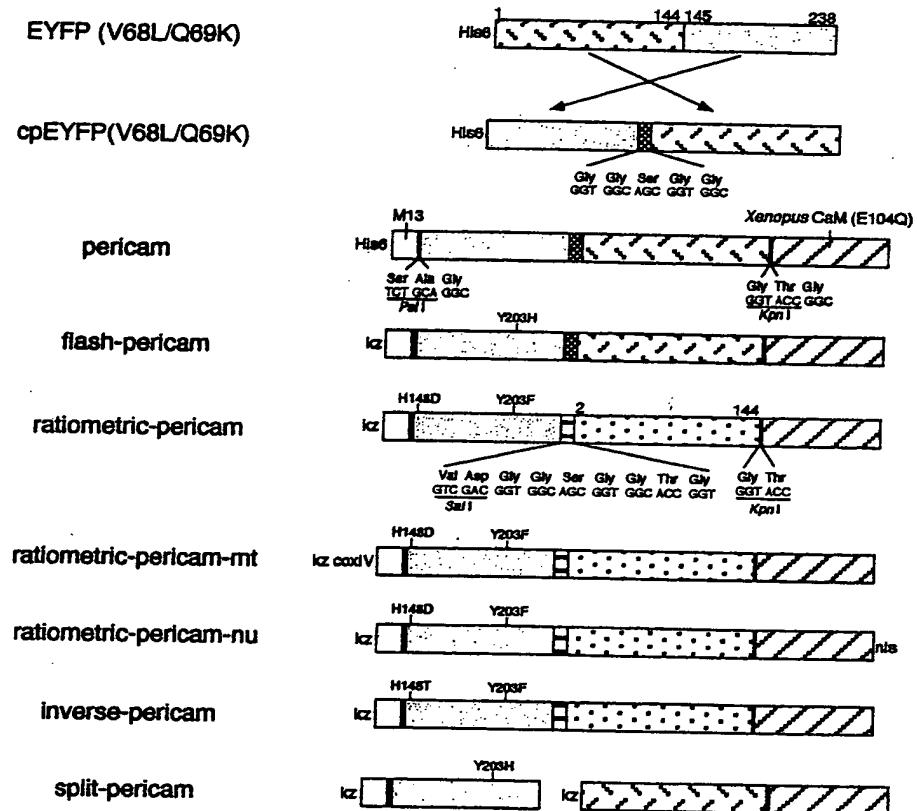
間経過を示す。それらの領域は、(B) の右側に示す。目盛棒は10 μ m。

【図6】

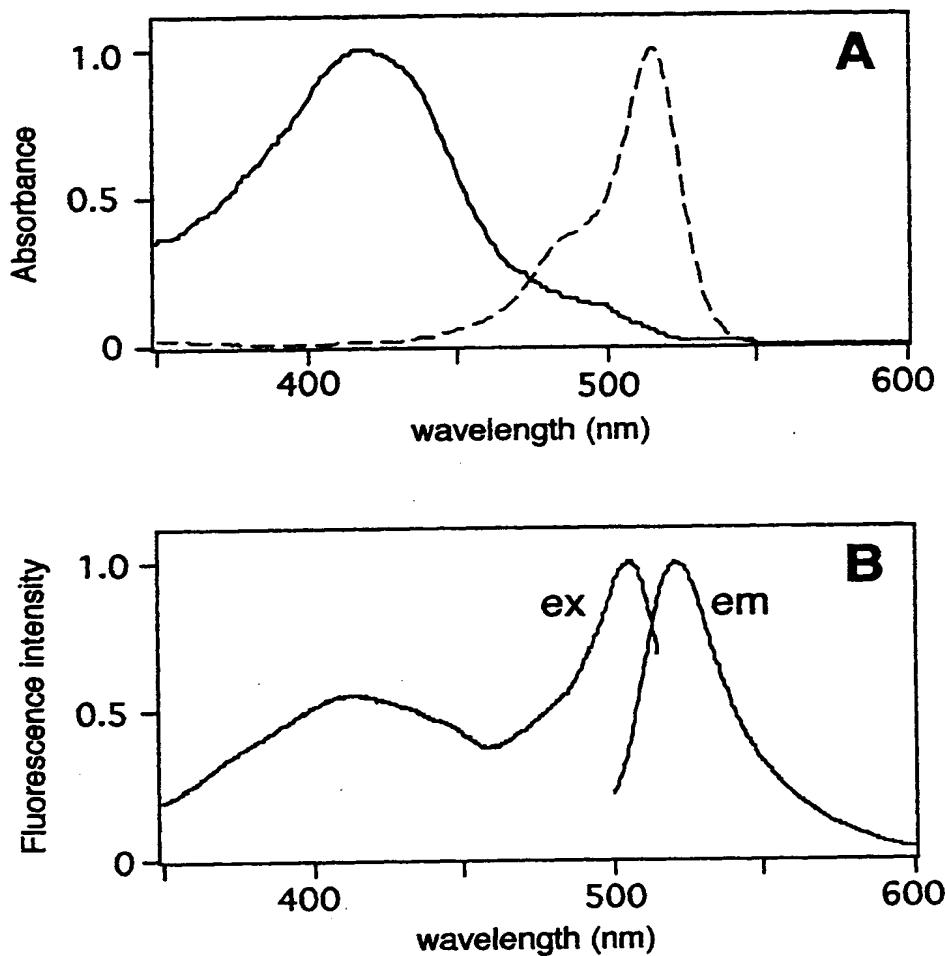
図6の(A)は、レシオメトリックペリカムnuおよびmtを発現した4つのHeLa細胞の一連の擬似着色画像を示す。左上から右下に向かって、1 μ Mのヒスタミン適用から、0、5、10、および65秒後を示す。一番左の細胞にみられる小円および大円は、それぞれ $[Ca^{2+}]_n$ および $[Ca^{2+}]_m$ 測定の目的とする領域である。これらの時間経過は、(A)の4つの画像を取得した時点の表示と共に、(B)に示す。図6の(C)は、レシオメトリックペリカムmtを発現する2つのHeLa細胞の一連の擬似着色画像を示す。矢印は、一過性に高 $[Ca^{2+}]_m$ を示すミトコンドリアの小集団を示す。目盛棒、10 μ m。

【書類名】 図面

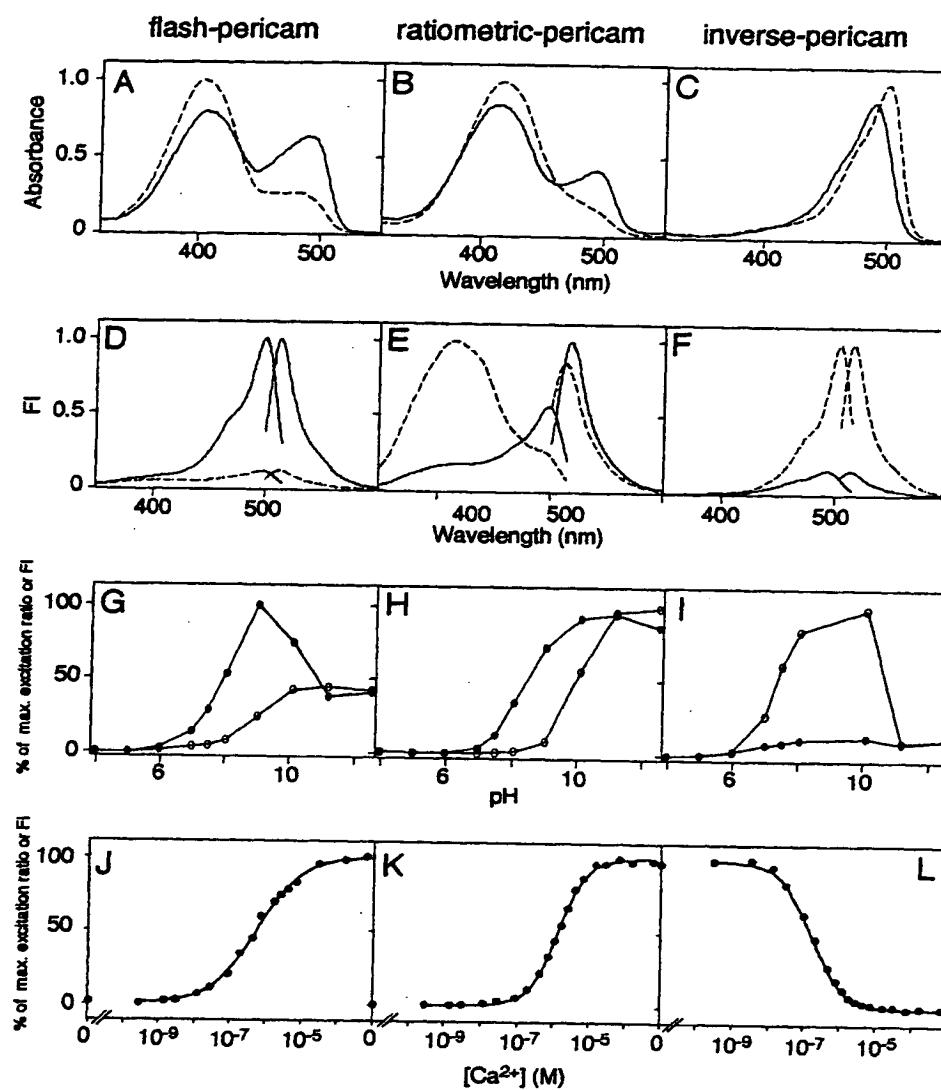
【図1】



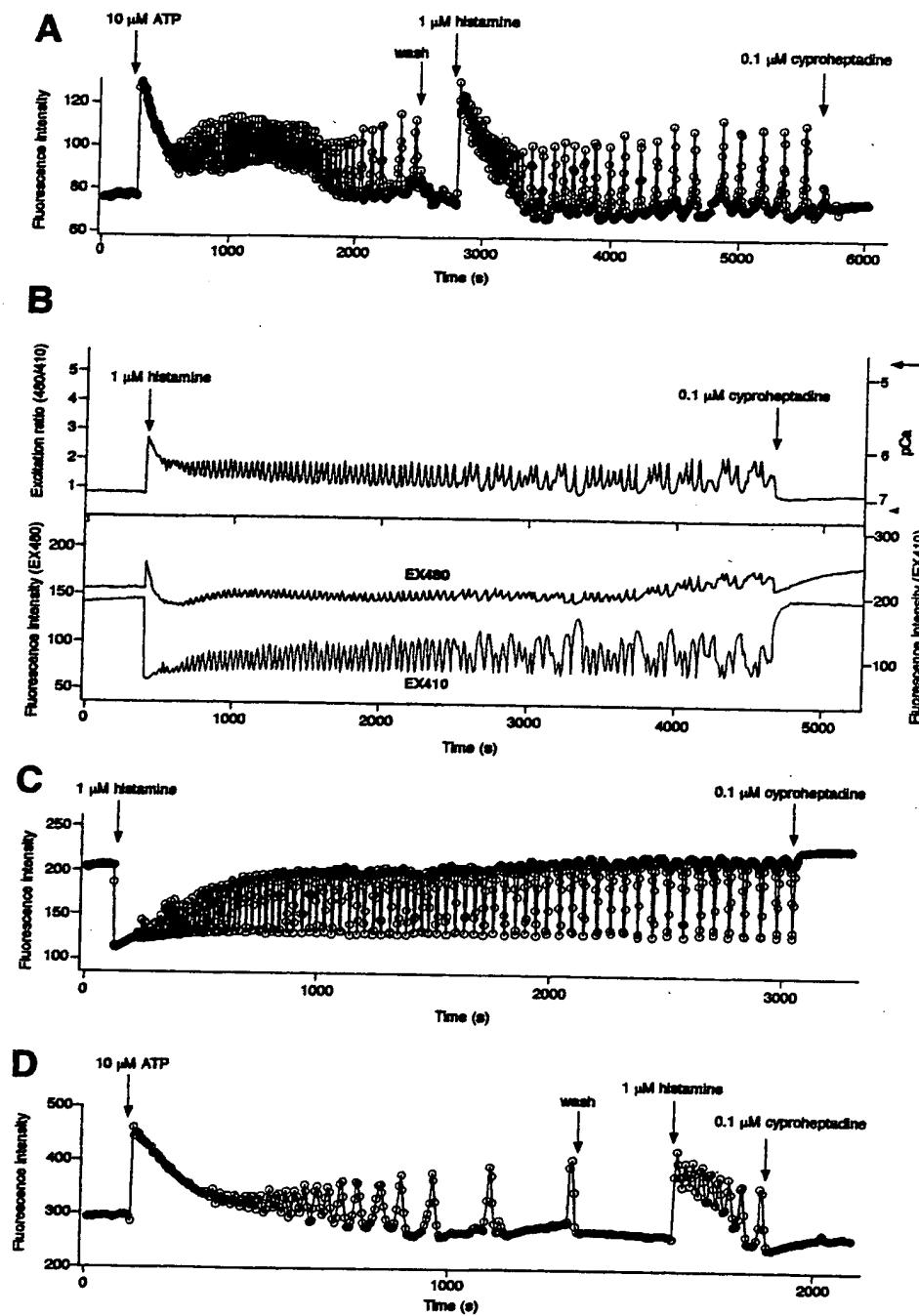
【図2】



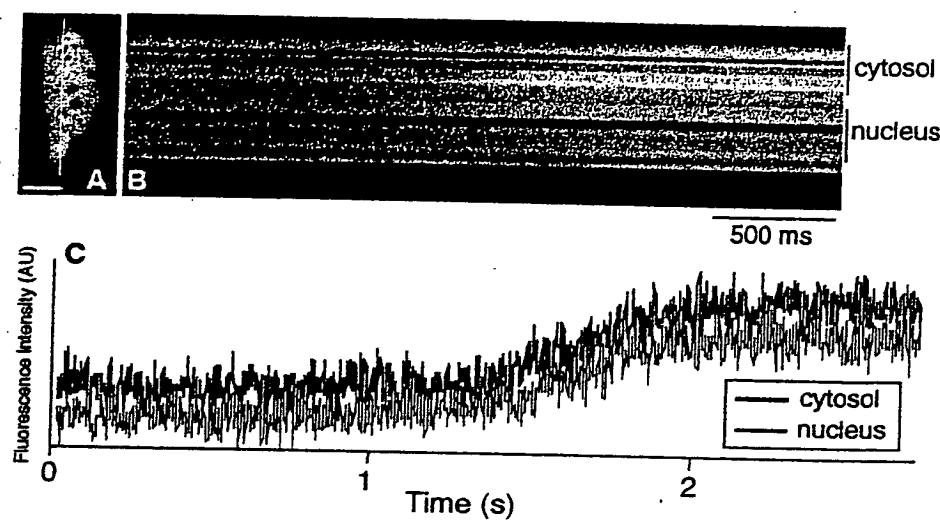
【図3】



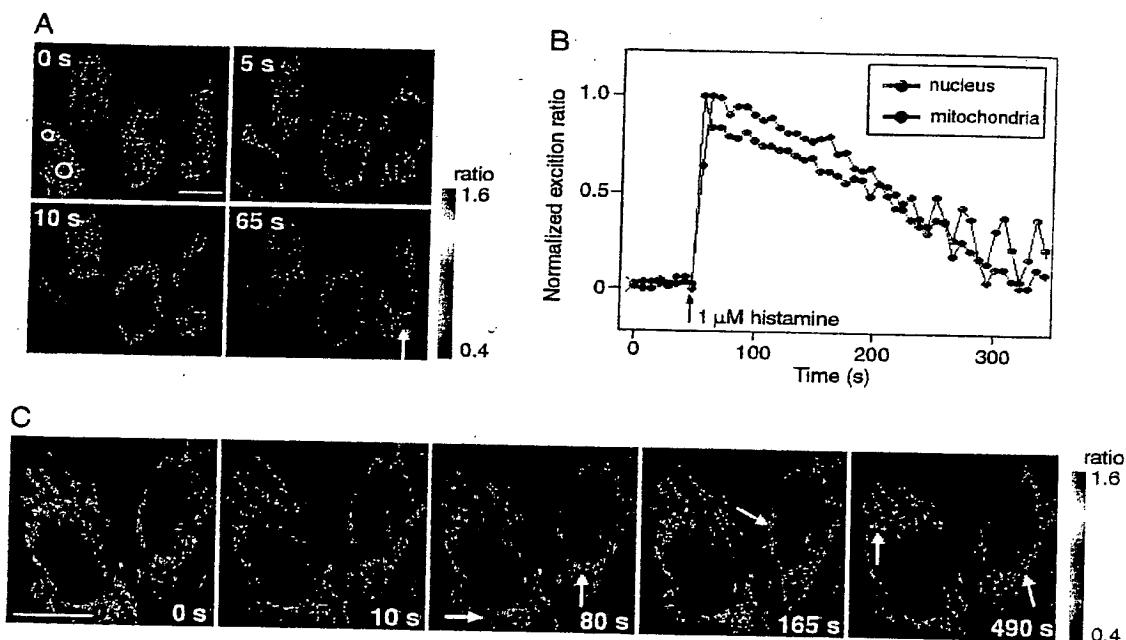
【図4】



【図5】



【図6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 カルシウムイオンに感受性のある新規な蛍光タンパク質、特に常温においてカルシウムイオン濃度を定量化するための指示薬として使用できる蛍光タンパク質を提供すること。

【解決手段】 N末端からC末端方向に以下のアミノ酸配列（1）～（3）を順番に有する蛍光タンパク質において、当該蛍光タンパク質にカルシウム結合タンパク質とその標的ペプチドとを融合して得られる融合蛍光タンパク質がCa²⁺イオンの量に依存した蛍光を発することができる特徴とする、蛍光タンパク質。

（1）緑色蛍光タンパク質又はその変異体、黄色蛍光タンパク質またはその変異体、シアン蛍光タンパク質またはその変異体、赤色蛍光タンパク質またはその変異体、及び青色蛍光タンパク質またはその変異体から成る群から選択される蛍光タンパク質のN末端からn番目のアミノ酸からC末端までのアミノ酸配列（ただし、nは140から150までの整数を示す）；

（2）2～20個のアミノ酸配列から成るリンカー配列；及び

（3）上記（1）に記載した蛍光タンパク質のN末端の1番目からn-1番目のアミノ酸配列：

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 [000006792]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住所 埼玉県和光市広沢2番1号

氏名 理化学研究所